



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07C 235/06, 233/05, C07J 9/00, A61K 47/48, 48/00, C12N 15/88	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/17823 (43) Date de publication internationale: 13 juin 1996 (13.06.96)
--	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01595

(22) Date de dépôt international: 4 décembre 1995 (04.12.95)

(30) Données relatives à la priorité:
94/14596 5 décembre 1994 (05.12.94) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BYK, Gerardo [IL/FR]; 3, impasse Eugène-Delacroix, F-94000 Créteil (FR). DUBERTRET, Catherine [FR/FR]; 14, rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR). SCHERMAN, Daniel [FR/FR]; 50, rue du Disque, F-75645 Paris Cédex 13 (FR).

(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction des Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).

(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: LIPOPOLYAMINES AS TRANSFECTION AGENTS AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF

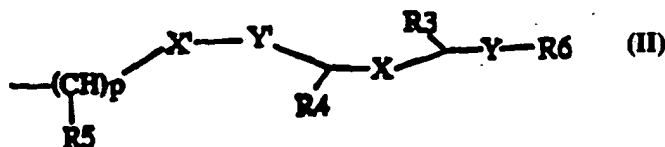
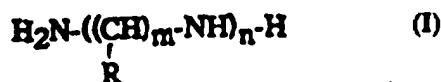
(54) Titre: LIPOPOLYAMINES COMME AGENTS DE TRANSFECTION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

(57) Abstract

Cationic lipids of general formula (I), wherein m is an integer from 2 to 6 inclusive; n is an integer from 1 to 9 inclusive, preferably 1-5, where, when n is 2-9, a single R grouping other than hydrogen is present in the general formula, and m has variable or identical values within the groupings (a) or $-(CH_2)_m-$; R is a hydrogen atom or a radical of general formula (II), wherein X and X', which are the same or different, are an oxygen atom, a methylene grouping $-(CH_2)_q-$ where q is 0, 1, 2 or 3, or an amino grouping $-NH-$ or $-NR'-$, where R' is a C_{1-4} alkyl grouping; Y and Y', which are the same or different, are a methylene grouping, a carbonyl grouping or a C=S grouping; R₃, R₄ and R₅, which are the same or different, are a hydrogen atom or an optionally substituted C_{1-4} alkyl radical, and p is 0-5; and R₆ is a cholesterol derivative or an alkylamino grouping $-NR_1R_2$, where R₁ and R₂ are, independently of each other, a straight or branched, saturated or unsaturated C_{12-22} aliphatic radical. Pharmaceutical compositions containing said lipids, and their uses for transfecting nucleic acids whether *in vitro* or *in vivo* in cells, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention se rapporte à des lipides cationiques de formule générale (I), dans laquelle m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement, n est un nombre entier compris entre 1 et 9 inclusivement et plus préférentiellement entre 1 et 5 avec, lorsque n est compris entre 2 et 9, un seul groupement R, différent de l'hydrogène, de présent dans la formule générale et des valeurs de m variables ou identiques au sein des différents groupements (a) ou $-(CH_2)_m-$. R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II), dans laquelle X et X' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(CH_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino $-NH-$ ou $-NR'-$ avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄. Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S. R₃, R₄ et R₅ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5. R₆ représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino $-NR_1R_2$ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques les contenant et leurs applications pour la transfection d'acides nucléiques, *in vitro* ou *in vivo* dans des cellules.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

LIPOPOLYAMINES COMME AGENTS DE TRANSFECTION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

5 La présente invention concerne de nouveaux composés apparentés à la famille des lipopolyamines, des compositions pharmaceutiques les contenant et leurs applications pour la transfection in vivo et/ou in vitro d'acides nucléiques.

10 De nombreuses maladies génétiques sont associées à un défaut d'expression et/ou une expression anormale, c'est à dire déficiente ou excessive, d'un ou plusieurs acides nucléiques. La thérapie génique a pour principal objectif de corriger ce type d'anomalies génétiques par le biais de l'expression cellulaire in vivo ou in vitro de gènes clonés.

15 Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont proposées pour la délivrance intracellulaire de ce type d'information génétique. L'une d'entre elles, en particulier, repose sur l'emploi de vecteurs chimiques ou biochimiques. Les vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'ADN à transfecter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, à travers les deux membranes nucléaires.

20 Un progrès important a été accompli dans ce mode de transfection avec le développement d'une technologie basée sur l'emploi d'un lipide cationique. Il a ainsi été mis en évidence qu'un lipide cationique chargé positivement, le chlorure de N-[1-(2,3-dioléiloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), interférait, sous la forme de liposomes ou de petites vésicules, spontanément avec de l'ADN, qui est chargé négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permettait ainsi la délivrance intracellulaire de l'ADN. Toutefois, bien que cette molécule soit efficace au niveau de la transfection, elle présente le désavantage d'être non biodégradable et de posséder un caractère toxique à l'égard des cellules.

30 Depuis le DOTMA, d'autres lipides cationiques ont été développés sur ce modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer". Parmi ceux-ci, on peut plus particulièrement citer ceux comprenant à titre de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre
35 représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les

DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement d'ammonium quaternaire. En général, l'activité transfectante de ces composés demeure toutefois assez faible.

Une autre catégorie de lipides cationiques, les lipopolyamines, a également été décrite. Dans ce type de composés, le groupement cationique est représenté par le radical L-5carboxyspermine qui contient quatre groupements d'ammonium, deux primaires et deux secondaires. Les DOGS et DPPES en font notamment partie. Ces lipopolyamines sont tout particulièrement efficaces pour la transfection de cellules endocrines primaires.

En fait, un agent de transfection synthétique idéal devrait présenter un haut niveau de transfection, et ce pour un large spectre de cellules, posséder une toxicité nulle ou à défaut une toxicité très minimisée aux doses d'utilisation, et enfin, être biodégradable pour s'affranchir de tout effet secondaire au niveau des cellules traitées.

La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouveaux composés susceptibles d'être utilisés efficacement dans la transfection *in vitro* et ou *in vivo* de cellules et notamment pour la vectorisation d'acides nucléiques.

Elle a pour premier objet des lipopolyamines, sous forme D, L ou LD et leurs sels, représentées par la formule générale I :

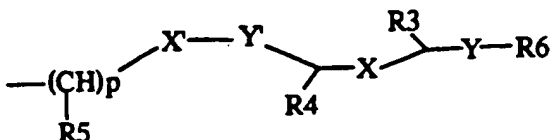


dans laquelle

- m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement,
- n est un nombre entier compris entre 1 et 9 inclusivement et plus préférentiellement entre 1 et 5 avec un seul groupement R différent de l'hydrogène de présent dans la formule générale et des valeurs de m variables ou identiques au sein des différents groupements $\underset{\text{R}}{\underset{|}{(\text{CH})_m}}$ et $-(\text{CH}_2)_m-$,

30

- R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale II:

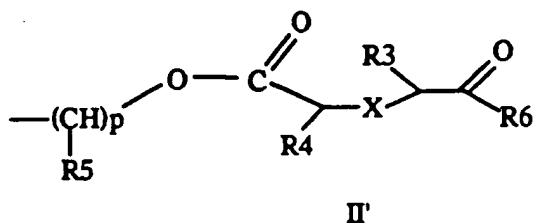


II

5 dans laquelle

- X et X' représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(CH_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino $-NH-$ ou $-NR'-$ avec R' représentant un groupement alkyle en C_1 à C_4 ,
- Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement $C=S$,
- R_3 , R_4 et R_5 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C_1 à C_4 , avec p pouvant varier entre 0 et 5,
- R_6 représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino $-NR_1R_2$ avec R_1 et R_2 représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou
- 15 non, linéaire ou ramifié en C_{12} à C_{22} .

D'un intérêt tout particulier sont les composés dans lesquels R y est représenté par la formule générale II'

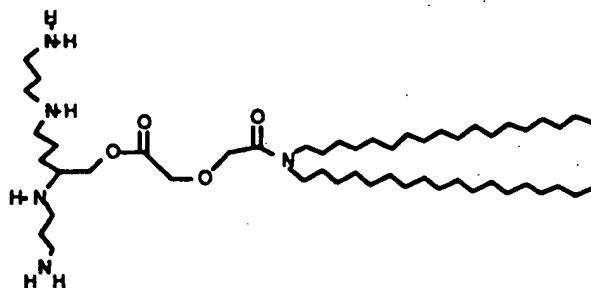


dans laquelle R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et p répondent aux définitions précédentes et X représente un atome d'oxygène ou un groupement $-(CH_2)_q-$ avec q étant égal à zéro.

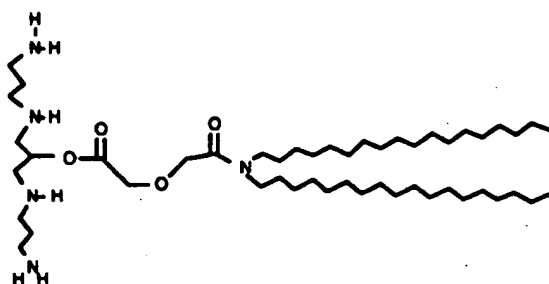
25 Cette famille de composés se caractérise notamment par la présence d'une liaison ester interne, intéressante sur le plan de la biodégradabilité.

A titre de lipopolyamines préférées selon l'invention, on peut plus particulièrement mentionner les composés suivants:

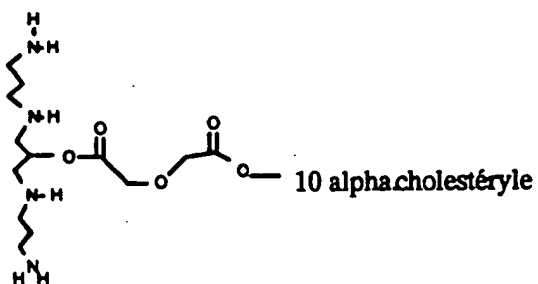
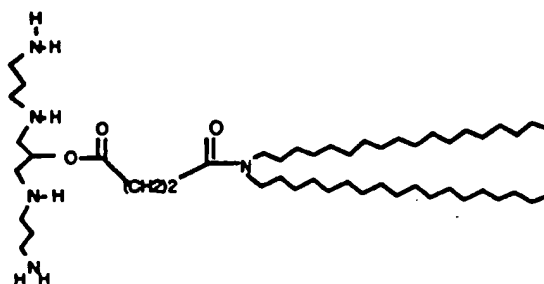
4



5



10



15

sous la forme D, L, DL ou l'un de leurs sels.

La présente invention a également pour objet toute application thérapeutique des lipopolyamines selon l'invention, soit directement, soit au sein de compositions pharmaceutiques.

5 Comme explicité précédemment, les composés de formule générale I s'avèrent tout particulièrement intéressants pour la transfection *in vitro* et *in vivo* d'acides nucléiques. Ils compactent efficacement l'ADN et présentent avantageusement une toxicité très réduite voire nulle à l'égard des cellules traitées. En outre, ils sont biodégradables notamment par hydrolyse de leur liaison ester.

10 Pour obtenir un effet maximal des compositions de l'invention, les proportions respectives du composé de formule générale I et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de manière à ce que le rapport R, charges positives de la lipopolyamine considérée par charges négatives dudit acide nucléique soit optimal. Ce rapport optimal variant en particulier selon le mode d'utilisation à savoir *in vivo* ou *in vitro* et selon le type cellulaire à transfecter, il est optimisé au cas par cas. Cette optimisation relève de la compétence de l'homme de l'art.

Dans les compositions de la présente invention, le polynucléotide peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, 20 d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent par ailleurs être incorporés 25 dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réplication, des 30 séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit

protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une

5 expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine

10 exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les

15 lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53,

20 Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine

25 choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la

30 protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger.etc.

L'acide nucléique thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de

35 gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par

exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus, d'autres virus ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne des compositions comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine telle que revendiquée et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. La demanderesse a en effet montré que le pouvoir transfectant des lipopolyamines peut être de manière inattendue augmenté en présence de certains adjuvants (lipides ou protéines par exemple), capables de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique.

Plus préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent, comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement avantageuses, notamment lorsque le rapport R est faible. La demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et, de manière surprenante, de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à 2 chaînes grasses.

De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -myristoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,1 à 20 équivalents d'adjuvant pour un équivalent de composé de formule générale I et, plus préférentiellement, de 1 à 5.

Les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale,

intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par
5 voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents
10 paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation in vivo, par injection ou greffe.

15 La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le traitement de maladies, comprenant l'administration in vivo ou in vitro d'un acide nucléique apte à corriger ladite maladie associé à un composé de formule générale I dans les conditions définies ci-avant. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou
20 nucléique et l'acide nucléique administré code pour ledit produit protéique ou contient ledit produit nucléique.

Elle s'étend à toute utilisation d'une lipopolyamine selon l'invention pour la transfection in vivo ou in vitro de cellules.

25 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

30 AcOEt : Acétate d'éthyle
BOP : Benzotriazol-1-yloxytris (diméthylamino) phosphonium
hexafluorophosphate
DCC : Dicyclohexylcarbodiimide
DCU : Dicyclohexylurée

	DMAP	: 4-Diméthylaminopyridine
	DMF	: Diméthylformamide
	DMSO	: Diméthyle sulfoxide
	DODA	: Dioctadécylamine
5	EP	: Ether de pétrole
	EtOH	: Ethanol
	NEt ₃	: Triéthylamine
	R _f	: Coefficient de rétention frontal
	TFA	: Acide trifluoroacétique
10	THF	: Tétrahydrofurane
	TMS	: Tétraméthylsilane
	UV	: Ultra-Violets

15

MATERIEL ET METHODES

A. Produits utilisés

La DODA, la NEt₃, le TFA, la L-ornithine, l'hydroxyde de tétraméthylammonium, le nickel de Raney, l'anhydride diglycolique proviennent de chez Fluka ; le BOP, de chez Propeptide France ; la DMAP, le chloroformate d'isobutyle et la N-méthylmorpholine, de chez Aldrich. Le THF provient de chez Merck ; tous les autres solvants utilisés sont des produits RP Prolabo. Les solutions de NaCl, de NaHCO₃ sont saturées ; la solution de KHSO₄ est à 0,5 M.

25

B. Mesures physiques

Les spectres de résonnance magnétique nucléaire du proton (RMN 1H) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS.

30

C. Chromatographies sur silice

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Merck de 0,2 mm d'épaisseur.

Révélations :

35 - Aux UV (254nm)

- A la ninhydrine, en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de ninhydrine (40 mg / 100 ml EtOH) pour révéler les amines ou les amides en chauffant à 150°C.

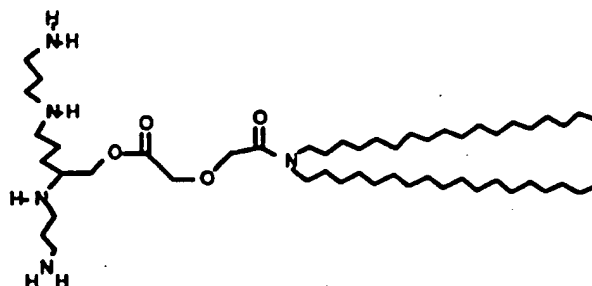
- A la fluorescamine, en vaporisant une solution (40 mg / 100 ml Acétone) pour révéler les amines primaires.

- A l'iode, en recouvrant la plaque de poudre d'iode.

5 Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.

EXEMPLE 1.

10 Synthèse du (Dioctadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle.



15

1.a Préparation du 2,5-Bis-(2-cyano-éthylamino)-pentanoate de tétraméthylammonium(1.a)

20 Du monohydrochlorure de l'acide(s)-2,5-diaminopentanoïque (L-ornithine) (6,74g; 40 mmol) et de l'hydroxyde de tétraméthylammonium pentahydraté (14,48g; 80 mmol) sont mis en solution dans du méthanol (20 ml). L'eau formée et le méthanol sont évaporés sous pression réduite (à l'aide d'une pompe à huile) de manière à obtenir un résidu sec.

25 Du N,N-diméthylformamide (30 ml) est ajouté aux sels précédemment obtenus. Le mélange est dégazé avec de l'azote, puis agité fortement pendant dix minutes, ce qui permet au 2,5-diamino pentanoate de tétraméthylammonium de se solubiliser (le chlorure de tétraméthylammonium reste en suspension dans le DMF).

L'acrylonitrile (6ml; 85,6 mol) est ajouté goutte à goutte; le ballon se réchauffe légèrement. Le mélange réactionnel est laissé 1h à température ambiante, sous azote.

30 Il est ensuite filtré pour éliminer le chlorure de tétraméthylammonium. Le DMF est

5 évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est un liquide huileux ; retiré de l'évaporateur rotatif, il se solidifie. De l'acétonitrile (100 ml) est ajouté et le ballon est légèrement chauffé jusqu'à obtention d'une solution translucide. Du THF est ajouté jusqu'à obtention d'une solution trouble. Le ballon est stocké pendant deux jours au congélateur ; le sel de tétraméthyl-ammonium du L-2,5-Bis-(2-cyano-éthylamino)-pentanoïque de l'acide est récupéré par filtration sous forme de solide blanc. Il est rincé au THF sur fritté, puis séché sur P₂O₅. 6,06 g sont obtenus, soit un rendement de 49 % (brut).

10 1.b Préparation du sel de tétraméthyl ammonium de l'acide 2.5-Bis-(3-amino-propylamino)-pentanoïque (1.b)

15 Le produit 1.a est solubilisé dans un mélange d'éthanol (18 ml), d'eau (2 ml) et de potasse 2 M (5 ml). La solution est purgée à l'argon. Du Nickel de Raney (2 ml de la suspension Fluka) est ajouté. L'hydrogénation est réalisée dans une autoclave, purgée à l'azote, à 26°C. En 3h, la pression est passée de 50,6 bars à 44,7 bars, puis s'est stabilisée plus d'une heure. L'autoclave fait 250 ml et le mélange réactionnel, 30 ml. La suspension obtenue est filtrée, rincée à l'eau et passée à l'évaporateur rotatif. Une huile jaune est obtenue. Le test à la fluorescamine est positif.

20

1.c Préparation de l'acide 2.5-Bis-(tert-butoxycarbonyl)-[3-(tert-butoxycarbonyl-amino)-propyl]-amino)-pentanoïque (1.c)

25 Le produit 1.b est dissous dans du dioxanne (30 ml). Du ditérbutyldicarbonate (17,46g ; 80 mmol) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité pendant une nuit. Le dioxanne est évaporé. Du KHSO₄ est ajouté. Le produit est extrait par CHCl₃ (3 x 100 ml). La phase organique est ensuite lavée successivement avec NaHCO₃ (pH=7,5), NaCl, puis séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. 10 g de produit sont obtenus (15,4 mmol, soit un rendement de 39% par rapport à l'ornithine).

30 CLHP : MeCN/H₂O: 0-3 min 50 % MeCN; 3-20 min 50-100 % MeCN, 20-40 min 100 % MeCN, K'= 7.96 (Colonne RP-18, débit=1 ml/min)

CCM : R_f (CHCl₃ : AcOEt ; 95 : 5 (v : v)) =0,28

RMN(ppm) : 1,3 (m, 8H, N+CH₂-CH₂-CH₂-CHN+COO/ 2x N+CH₂CH₂CH₂N+);
2,7-3,0 (m, 10 H 5x N+CH₂); 3,8 (t, 1H, N+CHCOO)
MS : MH⁺= 647, (PM= 646)

5 1.d Préparation du 2.5-Bis-[tert-butoxycarbonyl]-[3-(tert-butoxycarbonylamino)-propyl]-amino}-pentan-1-ol (1.d)

La L-5-carboxytétratert-butoxycarbonylspermine (1,94g; 3 mmol) est dissoute dans 30 ml de THF. 370 ml (3,1 mmol) de N-méthylmorpholine sont introduits à la micropipette. Le mélange réactionnel, mis sous azote, est refroidi à -15°C (dans un bain de carboglace et d'éthylène glycol) ; 390 ml (3,1 mmol) de chloroformate d'isobutyle sont alors ajoutés. Au bout de trois minutes, le mélange réactionnel est versé dans un becher contenant le NaBH₄ (2g) dissous dans 20 ml d'eau à 4°C. Le THF est évaporé. Du KHSO₄ est ajouté (jusqu'à Ph=7). Le produit est extrait à l'AcOEt, rincé au NaHCO₃, NaCl, séché sur MgSO₄, filtré puis évaporé. 1,15g sont obtenus, soit un rendement de 61%.

La CCM conduit à deux tâches ; une séparation sur colonne de silice, avec le même éluant, est donc réalisée et conduit à 0,97g de produit (huile jaune). Le rendement de la séparation est de 84 %.

20 Le rendement de la réduction est de 51 %.

CCM : R_f (EP : AcOEt ; 1 : 1 (v : v)) = 0,24

RMN (ppm) : 1,42 (s, 4xBoc); 1,5-1,7 (m, 8H N+CH₂-CH₂-CH₂-CHN/ 2x N+CH₂CH₂CH₂N); 2,85-3,2 (m, 10H 5x NCH₂) , 3,4 (m, 1H, NCHCH₂OH), 3,7 (d, 2H, CH₂OH), 6.8 (m, 2H; NH)

25 MS : MH⁺= 633, PM= 632

1.e Préparation de l'acide 2.5-Bis-[3-(tert-butoxycarbonylamino)-propyl]-[tert-butoxycarbonylamino]-pentyloxycarbonylméthoxy-acétique (1.e)

30 0,51 g (0,806 mmol) du produit 1.d sont dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂ ; 2 équivalents d'anhydride diglycolique (1,535 mmol ; 0,178 g), 2,2 équivalents de triéthylamine (1,687 mmol ; 235 µl) ainsi que 5 mg de DMAP sont ajoutés. Au bout d'une heure, la C.C.M. montrant que l'alcool a réagi, le mélange est additionné de CH₂Cl₂, puis lavé par 3 x 50 ml de KHSO₄, 3 x 50 ml de NaCl, séché sur MgSO₄,
35 filtré puis évaporé. 0,26 g de solide sont obtenus, soit un rendement de 43 %.

CCM : Rf (CHCl₃ : MeOH : AcOH ; 90 : 8 : 2 (v : v : v)) = 0,75

MS: MH⁺ = 749, PM = 748

5 1.f. Préparation du Diocadecyl-carbamoylmethoxy)-acétate du 2-5-bis-(tert-butoxycarbonyl-[3-(tert-butoxycarbonyl-amino)-propyl]-amino)-pentyle (1.f)

0,123 g de produit précédent (0,164 mmol), 1 équivalent (0,0856g) de dioctadécylamine, 3 équivalents de triéthylamine (68,4 ml), 1,1 équivalent (0,0798 g) de BOP sont dissous dans du CHCl₃. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante. Au bout de deux heures, le mélange est additionné de 100 ml de CH₂Cl₂, puis lavé par 3 x 100 ml de KHSO₄, de NaHCO₃, de NaCl (jusqu'à pH=7), séché, puis évaporé. 0,13 g de produit sont obtenus, soit un rendement de 63 %.

10 CCM : Rf (EP : AcOEt ; 1 : 1 (v : v)) = 0,62 ; révélation à l'iode, à la ninhydrine et à la fluorescamine.

15 RMN (ppm): 0.90 (t, J=7.5 Hz, 6H: CH₃, 1.20-1.75 (m, 108 H: CH₂ / C(CH₃)₃), 3.05-3.35 (m, 14 H: CH₂N), 4.15-4.35 (m, 3 H: NCHCH₂OCO), 4.23-4.27 (2s, 2x 2H: OCH₂CO), 4.5-5.5 (m, étalé, 2 H: NH)

MS: MH⁺ = 1252, P.M. = 1251

20 Analyse élémentaire : Formule brute : C₇₁H₁₃₇N₅O₁₂

% théoriques : C 68,06 H 11,02 N 5,59

% obtenus : C 67,14 H 11,93 N 5,86

25 1.g. Préparation du (Diocadecyl-carbamoylmethoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle (1.g)

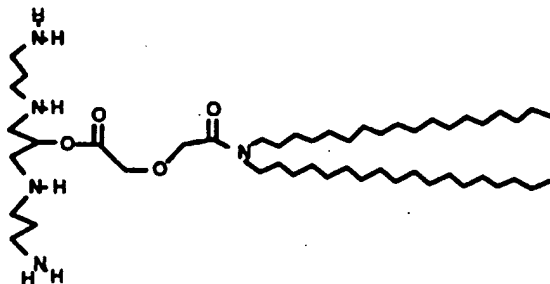
1 ml de TFA est ajouté à 0,025 g de produit 1.f (0,02 mmol) dans un tube "Eppendorf" ® de 1,5 ml et laissé une heure à température ambiante. Le TFA est évaporé.

30 500 µl d'éthanol sont ajoutés de façon à obtenir une solution à 40 mM, nécessaire pour les tests biologiques.

MS : MH⁺ = 852, P.M. = 851

35 **EXEMPLE 2.**

Préparation du (Dioctadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle (2.f.):



5

2.a Préparation du 1,3-Bis-(2-cyano-éthylamino)-propan-2-ol (2.a)

3,6 g (40 mmol) de 1,3-diaminopropan-2-ol sont dissous dans 75 ml de méthanol. 5,76 ml (80 mmol) d'acrylonitrile sont ajoutés en 15 minutes. Le test à la fluorescamine est positif. Le mélange réactionnel reste incolore. Il est laissé sous agitation, à température ambiante, pendant la nuit. Le test à la fluorescamine est alors négatif. Le méthanol est évaporé. 7,9 g de produit sont recueillis (rendement de 100 % pour le produit brut).

2.b Préparation du 1,3-Bis-(3-amino-propylamino)-propan-2-ol (2.b)

L'hydrogénation est réalisée dans une autoclave, purgée à l'azote, à 27°C. Le produit 2.a est solubilisé dans un mélange de 15 ml de méthanol, 10 ml d'éthanol, 5 ml de KOH (2 M). La solution est purgée à l'argon et 4 ml de la suspension de nickel de Raney sont ajoutés dans l'autoclave. En 3h30, la pression est passée de 51,6 bar à 37,6 bar, puis s'est stabilisée plus d'une heure. L'autoclave fait 250 ml et le mélange réactionnel, 30 ml. La suspension obtenue est filtrée, rincée à l'eau et passée à l'évaporateur rotatif. Une huile jaune est obtenue. Le test à la fluorescamine est positif.

25

2.c Préparation du 1,3-Bis-{3-tert-butoxycarbonyl-amino-(tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)}2-propan-2-ol (2.c)

Le produit 2.b est protégé de la même façon qu'en 1.c. 100 ml de CH₂Cl₂ sont ajoutés. 39,2 g (179 mmol) de di-tert-butylidicarbonate dissous dans 100 ml de

30

dioxanne sont ajoutés goutte à goutte. La solution est laissée sous agitation pendant 72h. Le solvant est évaporé, du KHSO_4 est ajouté. Le produit est extrait à l'AcOEt (3 x 100 ml) ; les phases sont rassemblées et rincées au KHSO_4 , au NaHCO_3 , au NaCl, séchées sur MgSO_4 et évaporées. 20 g sont obtenus (rendement de 83 % par rapport au produit initial)

5 Le produit est cristallisé dans l'EP.

C.C.M. : Rf (EP : AcOEt ; 1 : 1 (v : v)) = 0,23

Rf (EP : AcOEt ; 1 : 2 (v : v)) = 0,63

10 RMN (ppm) : 1,4 (2s, 36H : 4 x $(\text{CH}_3)_3$) ; 1,65 (qt, 4H : 2 x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$) ; 2,95 (q, 4H : 2 x NHCH_2CH_2) ; 3,1 (2d, 4H : $\text{NCH}_2\text{CHCH}_2\text{N}$) ; 3,2 (t, 4H : NCH_2CH_2) ; 3,85 (m, 1H : OH) ; 5,9 (s, 2H : NH)
MS : $\text{MH}^+ = 605$, PM = 604

15 2.d Préparation de l'acide 1.3-Bis-{3-tert-butoxycarbonyl-amino-(tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)}2-propyl-2-éthoxycarbonylméthoxy-acétique (2.d.)

604 mg (1mmol) de produit 2.c. sont dissous dans 20 ml de CH_2Cl_2 . 2 équivalents d'anhydride (2 mmol ; 0,232 g), 2,2 équivalents de NEt_3 (307 μl , puis 100 μl), 6,5 g de DMAP sont introduits. Après 24 h d'agitation à température ambiante, le mélange est additionné de CH_2Cl_2 , lavé au KHSO_4 , au NaCl, séché sur MgSO_4 , filtré puis évaporé. 0,156 g de produit sont obtenus (rendement de 22 %).

20 CCM : Rf (CHCl_3 : MeOH : AcOH ; 90 : 8 : 2 (v : v : v)) = 0,71

25 RMN (ppm) : 1,2-1,4 (2s, 36H : 4 x $(\text{CH}_3)_3$) ; 1,5 (m, 4H : 2 x $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 2,85 (q, 4H : 2 x NHCH_2CH_2) ; 3,1 (m, 8H : 4 x NCH_2) ; 3,9-4,2 (2s, 4H : 2 x OCH_2COO) ; 5,25 (m, 1H : CH_2CHCH_2) ; 6,7 (2H : NH)

MS : $\text{MH}^+ = 721$, PM = 720

30 2.e Préparation du (Diocadécyl-carbamoylméthoxy)- acétate du 1.3-Bis-{3-tert-butoxycarbonyl-amino-(tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)}2-propyle (2.e)

0,216 mmoles de l'acide 2.d sont dissoutes dans 3 ml de CHCl_3 . 1 équivalent de DODA (0,113 g), 3 équivalents de NEt_3 (100 μl) et 1,1 équivalent de BOP (0,11 g) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Le CHCl_3 est évaporé. 100 ml d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique est lavée par de l'HCl (0,5 M), par NaHCO_3 , par NaCl jusqu'à pH=7, séchée sur MgSO_4 puis

35

évaporée. 0,185 g sont obtenus (rendement 70 %). Une colonne sur silice est réalisée. 110 mg de produit sont recueillis (rendement 42 %).

CCM : R_f (CHCl₃ : MeOH : AcOH ; 90 : 8 : 2 (v : v : v)) = 0,81

R_f (EP : AcOEt ; 1 : 1 (v : v)) = 0,67

5

RMN (ppm) : 0,85(t, 6H : 2 x CH₃) ; 1,20-1,55 (m, 100H : CH₂/C(CH₃)₃) ; 1,6 (m, 4H : 2 x NHCH₂CH₂CH₂N) ; 3,05-3,4 (m, 16H : 2 x NHCH₂CH₂CH₂N / NCH₂CHCH₂N / 2 x CH₂N) ; 4,1 (s, 2H : NCOCH₂O) ; 4,15 (s, 2H : OCH₂COO) ; 5,25 (m, 1H : CH₂CHCH₂), 6,15 (m, 2H : NH)

10

MS : MH⁺ = 1224, PM = 1223

2.f Préparation du (Dioctadécyl-carbamoylmethoxy)-acétate de 1,3-Bis-{3-tert-butoxycarbonyl-amino-(tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)}-2-propyle(2.f):

15

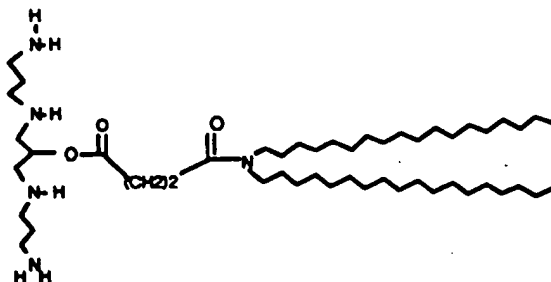
1 ml de TFA est ajouté à 0,0247 g de produit 2.e (0,021mmol) dans un tube "Eppendorf" ® de 1,5 ml et laissé une heure à température ambiante. Le TFA est évaporé.

505 µl d'éthanol sont ajoutés de façon à obtenir une solution à 40 mM, nécessaire pour les tests biologiques.

20

MS : MH⁺ = 824, P.M. = 823

EXEMPLE 3 : Préparation du (N,N-Dioctadécyl)-succinamate de 2-(3-amino-propylamino)-1-(3-amino-propylamino-méthyl)-éthyle



25

Ce composé est préparé selon le protocole décrit précédemment en exemple 2, en substituant à l'acide diglycolique, l'acide succinique.

L'analyse en spectrométrie de masse du produit ainsi obtenu indique un fragment MH⁺ de 808, ce qui est conforme à la masse attendue.

30

UTILISATION DE LIPOPOLYAMINES SELON L'INVENTION POUR LA TRANSFECTION IN VITRO DE MATERIEL GENETIQUE

5

A Plasmides utilisés pour le transfert de gènes in vitro

On utilise le plasmide pCMV-LUC. Il s'agit d'une construction comportant le gène rapporteur "luciférase", dérivée soit du plasmide pGL2-Basic Vector (Promega) soit du plasmide pGL2-Control Vector (Promega) par insertion d'un fragment Mlu I-Hind III contenant le promoteur du Cytomegalovirus humain (CMV), extrait du plasmide vecteur pcDNA3 (Invitrogen).

15

B Protocole de préparation des solutions utilisées pour la transfection

Des lipopolyamines préparées selon des exemples précédents sont mises en solution à 40 mM dans l'éthanol puis dilués dans un mélange éthanol/eau en maintenant une concentration éthanolique inférieure à 10%.

Les solutions d'acide nucléique à transfecter sont diluées en sérum physiologique (NaCl 0,15M) puis ajoutées aux solutions de lipopolyamine, dans un rapport 1/1 (v/v). Après homogénéisation au vortex et incubation 15 minutes à température ambiante, les solutions ADN/lipopolyamine sont distribuées à 9% (v/v) final dans les puits où les cellules ont été lavées par du milieu de culture dépourvu de protéines (sérum).

25 EXEMPLE 4 :

Influence du rapport de charge (amines/phosphates) sur l'efficacité de transfection.

Des échantillons de 1.10^5 cellules NIH 3T3 en phase exponentielle de croissance sur 2 cm² sont traités par des solutions lipopolyamines/pCMV-LUC, présentant des rapports de charges variables, pendant 4 heures à 37°C sous 5% CO₂ ; chaque échantillon reçoit 1 µg d'acide nucléique. La recherche de l'expression du gène reporter est effectuée après addition de sérum de veau foetal à 8% final suivie d'une incubation de 40 heures dans l'étuve à CO₂.

L'activité luciférase est dosée par l'émission de lumière [RLU = relative light unit] en présence de luciférine, coenzyme A et ATP pendant 20 secondes et rapportée au µg de

protéine dans le surnageant obtenu après lyse des cellules. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau I ci-dessous.

5

rapport de charge	Lipopolyamine de l'exemple 1		Lipopolyamine de l'exemple 2	
	luminescence	coef. de var. (%)	luminescence	coef. de var. (%)
1	69	5	23	34
2	5091	3	252	6
4	3636	30	7890	3
6	21334	3	61401	5
8	40846	3	73224	2
10	55321	1	77633	2
12	53239	5	48634	5
14	36	10	52417	2
ADN seul	52	5		

TABLEAU I

10

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois essais indépendants.

Cette expérience montre clairement que les lipopolyamines selon l'invention permettent le transfert de gènes dans les conditions requises pour leur expression.

15 **EXEMPLE 5 :**

Influence de la concentration en acide nucléique dans les mélanges ADN/lipopolyamine.

Selon le même protocole que celui décrit dans l'exemple précédent les cellules NIH
20 3T3 sont traitées avec des mélanges ADN/lipopolyamines dans les conditions où différentes concentrations d'ADN sont utilisées pour un même rapport de charge. Dans ce cas, l'activité luciférase est mesurée pendant 20 secondes et rapportée à $2,5 \cdot 10^3$ cellules traitées. Les résultats sont présentés en tableaux II et III ci-dessous.

Lipopolyamine de l'exemple 1

$\mu\text{g DNA}$	Rapport de charge			
	x 4	x 6	x 8	x 10
0,25	27 (19)	25 (20)	32 (31)	36 (15)
0,5	23 (5)	37 (54)	4476 (4)	4811 (19)
1,0	4945 (12)	19194 (14)	30933 (21)	39357 (3)
2,0	93937 (2)	105533 (1)	111167 (14)	8315 (15)
3,0	106293 (11)	100093 (8)	53475 (12)	
4,0	98553 (10)	69863 (8)		

5

TABLEAU II

10 Lipopolyamine de l'exemple 2

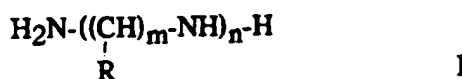
$\mu\text{g DNA}$	Rapport de charge			
	x 4	x 6	x 8	x 10
0,25	40 (17)	52 (64)	122 (14)	51 (5)
0,5	28 (10)	204 (25)	36533 (7)	44473 (7)
1,0	3427 ((12)	48167 (13)	49363 (13)	50083 (9)
2,0	33377 (13)	44697 (18)	30670 (16)	9544 (4)
3,0	9686 (3)	31557 (2)	9157 (8)	
4,0	4321 (9)	40105 (10)		

TABLEAU III

- 15 Chaque valeur correspond à la moyenne de trois essais indépendants.
Les valeurs portées entre parenthèses correspondent au coefficient de variation exprimé en %.

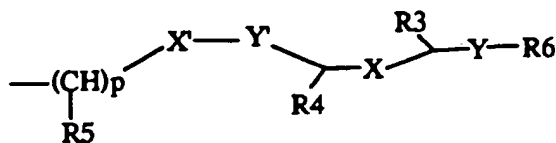
REVENDICATIONS

1. Lipopolyamine sous forme D, L, ou DL ou l'un de ses sels caractérisée en ce
 5 qu'elle est représentée par la formule générale I



10 dans laquelle

- m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement,
 - n est un nombre entier compris entre 1 et 9 inclusivement et plus préférentiellement entre 1 et 5 avec, lorsque n est compris entre 2 et 9, un seul groupement R, différent de l'hydrogène, de présent dans la formule générale et des valeurs de m variables ou
 - 15 identiques au sein des différents groupements $-(\text{CH})_m-$ ou $-(\text{CH}_2)_m-$.
- $$\begin{array}{c} | \\ \text{R} \end{array}$$
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale II:



20

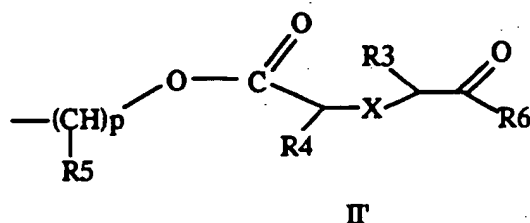
II

dans laquelle

- 25 - X et X' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(\text{CH}_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino $-\text{NH}-$ ou $-\text{NR}'-$ avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄,
- Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S,
- 30 - R₃, R₄ et R₅ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5,

- R_6 représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino $-NR_1R_2$ avec R_1 et R_2 représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C_{12} à C_{22} .

- 5 2. Lipopolyamine selon la revendication 1 caractérisé en ce que R y est représenté de préférence par la formule générale II'

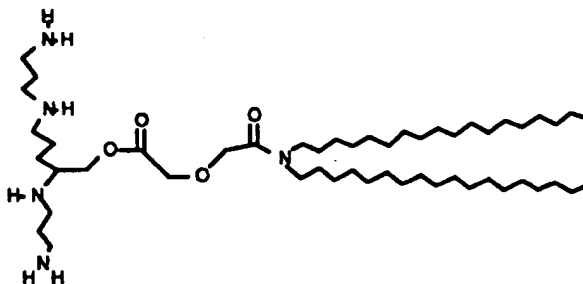


10

dans laquelle R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et p répondent aux définitions proposées en revendication 1 et X représente un atome d'oxygène ou un groupement $-(CH_2)_q-$ avec q étant égal à zéro.

15

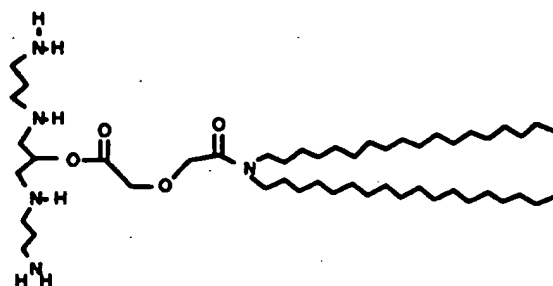
3. Lipopolyamine selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du



20 sous forme D, L, DL ou l'un de ses sels.

4. Lipopolyamine selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du

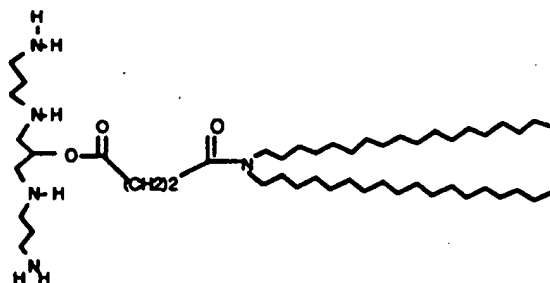
25



sous forme D, L, DL ou l'un de ses sels.

5. Lipopolyamine selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du

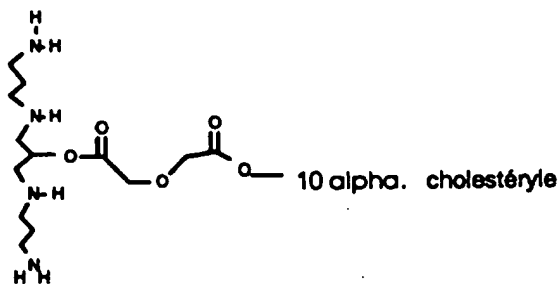
5



sous forme D, L, DL ou l'un de ses sels.

10

6. Lipopolyamine selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du



15

sous forme D, L, DL ou l'un de ses sels.

7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins une

20 lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 6 et au moins un acide nucléique.

8. Composition selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.
9. Composition selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.
- 5 10. Composition selon la revendication 7, 8 ou 9 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.
11. Composition selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un antisens.
12. Composition selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.
- 10 13. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que le gène thérapeutique code pour une protéine impliquée dans le métabolisme des lipides comme par une apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), une enzyme telle la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique ou autres lipases, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, une protéine de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les
- 20 récepteurs scavenger.
14. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 6 et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et d'améliorer son pouvoir transfectant.
15. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que l'adjuvant est un ou
- 25 plusieurs lipides neutres.
16. Composition selon la revendication 15 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les lipides synthétiques ou naturels, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques.

17. Composition selon la revendication 16 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont des lipides à 2 chaînes grasses.
18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi la dioléoylphosphatidyléthanamine (DOPE), l'oléoyl-
5 palmitoylphosphatidyléthanamine (POPE), le di-stéaroyl, -palmitoyl, -myristoyl phosphatidyléthanamine ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cébrosides (tels que notamment les galactocébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et
10 GM2).
19. Composition selon l'une des revendications 14 à 18 caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,1 à 20 équivalents d'adjuvant pour 1 équivalent de lipopolyamine, et, plus préférentiellement, de 1 à 5.
20. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 19 caractérisée en ce
15 qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
21. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.
- 20 22. Utilisation d'une lipopolyamine selon l'une des revendications de 1 à 6 pour la transfection in vivo ou in vitro de cellules.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/FR 95/01595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07C235/06 C07C233/05 C07J9/00 A61K47/48 A61K48/00
C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 394 111 (CENTRE NATIONALE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 October 1990 see page 5, line 36 - page 6, line 10; claims; examples ---	1-22
A	WO,A,94 05624 (LIFE TECHNOLOGIES INC.) 17 March 1994 see page 4, line 25 - page 5, line 8 see page 6, line 5 - page 8, line 19 ---	1-22
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 86, September 1989 WASHINGTON US, pages 6982-6986, J.-P. BEHR ET AL. 'Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA' see the whole document ---	1-22
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 March 1996

Date of mailing of the international search report

10.04.96

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentamt 2
NL - 2240 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Te. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seufert, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/FR 95/01595

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 5, no. 6, 1994 WASHINGTON US, pages 647-654, J.-P. BEHR ET AL. 'Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules' see the whole document ---	1-22
A	TETRAHEDRON LETTERS, vol. 27, no. 48, 1986 OXFORD GB, pages 5861-5864, J. P. BEHR 'DNA strongly bibds to micelles and vesicles containing lipopolyamines or lipointercalants' ---	1-22
X	FR,A,2 066 157 (BASF) 6 August 1971 see page 5, line 6 - line 9 see page 5, line 34 - line 40 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/01595

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/01595

Compared with the original claim 1 as filed, the present claim 1 is not very clear. In the view of the Searching Authority the definition of the substituents now allows for compounds I wherein $n = 1$ and $R = H$. These compounds are obviously not novel, nor are they lipopolyamines (see DE-A-1 953 263; compounds wherein $m = 3-5$ are also known).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01595

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0394111	24-10-90	FR-A- 2645866	19-10-90
		CA-A- 2014518	17-10-90
		FR-A- 2646161	26-10-90
		IL-A- 94077	29-12-94
		JP-A- 2292246	03-12-90
		US-A- 5476962	19-12-95
		US-A- 5171678	15-12-92

WO-A-9405624	17-03-94	US-A- 5334761	02-08-94
		EP-A- 0656883	14-06-95

FR-A-2066157	06-08-71	DE-A- 1953263	17-02-72
		BE-A- 757840	22-04-71
		CA-A- 918678	09-01-73
		GB-A- 1319495	06-06-73
		NL-A- 7015579	27-04-71
		US-A- 4014933	29-03-77
		US-I- 8391828	06-04-76

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No
PCT/FR 95/01595

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07C235/06 C07C233/05 C07J9/00 A61K47/48 A61K48/00
C12N15/88

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 394 111 (CENTRE NATIONALE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 Octobre 1990 voir page 5, ligne 36 - page 6, ligne 10; revendications; exemples ---	1-22
A	WO,A,94 05624 (LIFE TECHNOLOGIES INC.) 17 Mars 1994 voir page 4, ligne 25 - page 5, ligne 8 voir page 6, ligne 5 - page 8, ligne 19 ---	1-22
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 86, Septembre 1989 WASHINGTON US, pages 6982-6986, J.-P. BEHR ET AL. 'Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA' voir le document en entier ---	1-22
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 Mars 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10.04.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patmidaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Seufert, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/01595

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 5, no. 6, 1994 WASHINGTON US, pages 647-654, J.-P. BEHR ET AL. 'Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules' voir le document en entier ---	1-22
A	TETRAHEDRON LETTERS, vol. 27, no. 48, 1986 OXFORD GB, pages 5861-5864, J. P. BEHR 'DNA strongly binds to micelles and vesicles containing lipopolyamines or lipointercalants' ---	1-22
X	FR,A,2 066 157 (BASF) 6 Août 1971 voir page 5, ligne 6 - ligne 9 voir page 5, ligne 34 - ligne 40 -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

...ande internationale n°

PCT/FR95/01595

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR PCT/ISA/

En comparaison avec la revendication 1 du premier dépôt la revendication 1 du presente demande n'est pas très claire. Selon l'opinion de l'examineur de recherche la definition des substituants permet maintenant des composés I avec $n=1$ et $R=H$. Ces composés ne sont évidemment ni nouveaux ni lipopolyamines (voir DE1953263; composés avec $m = 3-5$ sont aussi connus).

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 95/01595

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0394111	24-10-90	FR-A- 2645866	19-10-90
		CA-A- 2014518	17-10-90
		FR-A- 2646161	26-10-90
		IL-A- 94077	29-12-94
		JP-A- 2292246	03-12-90
		US-A- 5476962	19-12-95
		US-A- 5171678	15-12-92

WO-A-9405624	17-03-94	US-A- 5334761	02-08-94
		EP-A- 0656883	14-06-95

FR-A-2066157	06-08-71	DE-A- 1953263	17-02-72
		BE-A- 757840	22-04-71
		CA-A- 918678	09-01-73
		GB-A- 1319495	06-06-73
		NL-A- 7015579	27-04-71
		US-A- 4014933	29-03-77
		US-I- 8391828	06-04-76

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/87, 15/11, C07K 14/00, A61K 48/00, 9/127, 9/50, 31/70		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/21931 (43) Date de publication internationale: 17 août 1995 (17.08.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00098 (22) Date de dépôt international: 27 janvier 1995 (27.01.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/01381 8 février 1994 (08.02.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BAZILE, Didier [FR/FR]; 25, rue Albert-de-Mun, F-94100 Saint-Maur-des-Fosses (FR). EMILE, Carole [FR/FR]; 144, boulevard de Charonne, F-75020 Paris (FR). HELENE, Claude [FR/FR]; 14, quai d'Orléans, F-75004 Paris (FR). SPENLEHAUER, Gilles [FR/FR]; 10, place Ovale, F-94230 Cachan (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	

(54) Title: **NUCLEIC ACID-CONTAINING COMPOSITION, ITS PREPARATION AND USE**(54) Titre: **COMPOSITION CONTENANT DES ACIDES NUCLEIQUES, PREPARATION ET UTILISATIONS**

(57) Abstract

Compositions including nucleic acids and cationic oligopeptides capable of forming secondary structures, and their use in therapeutics and gene therapy, in particular for transferring nucleic acids into cells, are disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des compositions comprenant des acides nucléiques et des oligopeptides cationiques capables de former des structures secondaires, et leur utilisation en thérapeutique et en thérapie génique, notamment pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bразил	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

COMPOSITION CONTENANT DES ACIDES NUCLEIQUES
PREPARATION ET UTILISATIONS

La présente invention concerne des compositions à base d'acides nucléiques, leur préparation et leur utilisation. Plus particulièrement, elle concerne des compositions comprenant des acides nucléiques et des oligopeptides et leur utilisation en thérapie génique, notamment pour le transfert d'acides nucléiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Différentes techniques ont été décrites pour le transfert de cette information génétique, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Toutefois, les techniques développées jusqu'à présent ne permettent pas de résoudre de manière satisfaisante les difficultés liées au transfert de gènes dans les cellules et/ou l'organisme. En particulier, les problèmes liés à la pénétration de l'acide nucléique dans les cellules ne sont pas entièrement résolus. En effet, la nature polyanionique des acides nucléiques prévient leur passage à travers les membranes cellulaires. S'il a été montré que les acides nucléiques nus sont capables de traverser la membrane plasmique ex vivo (voir notamment la demande n° WO90/11092), l'efficacité de transfection reste assez faible. De plus, les acides nucléiques nus ont une demi-vie plasmatique courte, en raison de leur dégradation par les enzymes et de leur élimination par les voies urinaires. Par ailleurs, si les virus recombinants permettent d'améliorer l'efficacité de transfert des acides nucléiques, leur emploi présente certains

risques tels que la pathogénicité, la transmission, la réplication, la recombinaison, la transformation, etc.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ces différents problèmes. La demanderesse a en effet montré qu'il est possible de former des paires
5 d'ions entre des oligopeptides cationiques particuliers et les groupements phosphates des acides nucléiques, et que les complexes ainsi formés sont stables, et sont capables de pénétrer les cellules ou d'être encapsulés dans des vecteurs de transfert tels que des liposomes, des nanoparticules ou des lipoprotéines de faible densité (LDL) avec des rendements élevés.

10 Un premier objet de l'invention réside donc dans une composition comprenant un acide nucléique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires. Le terme structure secondaire désigne les peptides capables d'adopter une conformation spatiale particulière dans des conditions physiologiques, par opposition
15 aux peptides ne présentant pas d'organisation particulière de leur structure primaire. La structure secondaire peut apparaître soit dans certains solvants, soit en solution aqueuse, soit après complexation avec l'acide nucléique.

Plus particulièrement, les oligopeptides utilisés dans le cadre de l'invention sont capables de former des hélices α ou des feuillets β .

La complexation d'un acide nucléique avec une polylysine a déjà été décrite
20 dans l'art antérieur. Cependant, le taux de complexation et la stabilité du complexe formé avec la polylysine sont relativement faibles, et ces complexes ne peuvent être encapsulés dans des vecteurs de transfert de façon satisfaisante (voir exemples). Au contraire, les complexes selon l'invention, qui impliquent des oligopeptides cationiques capables de former des structures secondaires (hélices α , feuillets β) présentent une
25 stabilité élevée, peuvent être obtenus avec des rendements proches de 100%, et sont capables d'être encapsulés avec des rendements élevés dans des vecteurs de transfert. Ces complexes constituent donc des outils particulièrement avantageux pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Par ailleurs, selon la nature du vecteur de transfert utilisé, les compositions de l'invention peuvent être utilisées sur des
30 cellules extraites de l'organisme (ex vivo) en vue de leur réadministration, ou directement in vivo.

Plus particulièrement, les oligopeptides utilisés dans le cadre de la présente invention répondent à la formule $(A_O A_Y A_Y A_O)_n$ ou $(A_O A_Y A_O A_Y)_n$ dans laquelle A_O est un acide aminé hydrophobe, A_Y est un acide aminé hydrophile, et n est un nombre entier supérieur ou égal à 4. La demanderesse a en effet montré que de tels oligopeptides sont capables, une fois complexés aux acides nucléiques, de former des structures secondaires qui stabilisent fortement lesdits complexes.

Plus préférentiellement, l'acide aminé hydrophobe est choisi parmi la leucine, la valine, l'isoleucine et la phénylalanine; et l'acide aminé hydrophile est choisi parmi la lysine, l'arginine et l'histidine.

La capacité des oligopeptides à former des structures secondaires peut être vérifiée par dichroïsme circulaire ou en RMN, comme indiqué dans les exemples.

Encore plus préférentiellement, l'oligopeptide selon l'invention est choisi parmi les oligopeptides de formule $(LKKL)_n$, $(LKLK)_n$, $(LRRL)_n$, dans lesquelles n est défini comme précédemment.

D'une manière générale, dans les oligopeptides de l'invention, n peut varier entre 4 et 100, de préférence entre 10 et 50. La valeur de n est adaptée par l'homme du métier en fonction de la longueur et de la nature de l'acide nucléique, de la composition de l'oligopeptide, de l'utilisation recherchée, etc.

Pour obtenir un effet optimum des compositions de l'invention, les proportions respectives de l'oligopeptide et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de sorte que le rapport charges positives de l'oligopeptide / charges négatives de l'acide nucléique soit égal ou supérieur à 1 (ce rapport est désigné R dans les exemples). Ainsi, plus l'acide nucléique est long, plus le nombre de charges positives apporté par l'oligopeptide doit être élevé pour obtenir un effet maximum. Ceci peut se traduire soit par l'utilisation d'oligopeptides dans lesquels la valeur de n est plus élevée, soit par l'utilisation de quantités plus élevées d'oligopeptides, soit encore par les deux.

Les oligopeptides utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier. Préférentiellement, ils sont synthétisés par voie chimique, au moyen d'un synthétiseur de peptides, en utilisant tout type de chimie connue de l'homme du métier (F-moc, T-boc, etc). Lorsque les valeurs

de n sont élevées, il est par ailleurs possible de synthétiser les oligopeptides en plusieurs fragments qui sont ensuite assemblés. Par ailleurs, selon la technique de synthèse utilisée (par exemple en phase homogène), l'oligopeptide obtenu peut être non pas un composé défini, mais un mélange d'oligopeptides ayant des longueurs
5 différentes centrées autour d'une moyenne. Dans ce cas, la valeur de n de la formule de l'invention représente la moyenne des valeurs des n des différents constituants du mélange. Des méthodes de synthèse appropriées sont données dans les techniques générales de biologie moléculaire et dans les exemples.

Au sens de la présente invention, le terme acide nucléique comprend aussi
10 bien les acides désoxyribonucléiques que les acides ribonucléiques. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute
15 technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent par ailleurs être incorporés dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent
20 être simple ou double brin. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription, des séquences antisens, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour une ou des protéines (ou peptide ou polypeptide) ayant une activité
25 pharmacologique. Il peut s'agir d'enzymes, d'hormones, de facteurs de croissance, de lymphokines, d'apolipoprotéines, etc. Par séquence antisens, on entend toute séquence capable, directement ou indirectement (après transcription en ARN) de réduire les niveaux d'expression d'une protéine désirée, voire de les supprimer (EP 140 308). Les antisens comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont
30 capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Concernant plus particulièrement les acides ribonucléiques (ARN), il peut s'agir d'ARN antisens, capables de bloquer au moins partiellement la traduction d'ARNm cibles (cellulaires, viraux, bactériens, etc); ou également de ribozymes ou

d'acides nucléiques capables de se lier à un autre acide nucléique par formation d'une triple hélice.

Les compositions selon l'invention peuvent être utilisés in vitro, ex vivo ou in vivo. In vitro, elles peuvent permettre de transférer à des lignées cellulaires des séquences d'acides nucléiques désirées, par exemple dans le but d'exprimer une protéine recombinante ou une activité antisens, ou dans le but d'inhiber une protéine, par fixation de ladite protéine sur l'acide nucléique. Ex vivo, elles peuvent être utilisés pour le transfert thérapeutique d'un acide nucléique dans une cellule issue d'un organisme, en vue de conférer à ladite cellule des propriétés nouvelles ou renforcées, avant sa réadministration à un organisme. In vivo, elles peuvent être utilisés pour l'administration directe d'acide nucléique.

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Comme indiqué plus haut, ce transfert peut être effectué in vitro, ex vivo ou in vivo.

Les compositions selon l'invention peuvent permettre de transférer des acides nucléiques dans des types variés de cellules. Préférentiellement, il s'agit de cellules animales, de préférence humaine. Il peut s'agir notamment de cellules hématopoiétiques, endothéliales, myoblastiques, etc. Par ailleurs, il peut s'agir aussi bien de cellules saines que de cellules affectées par des dysfonctionnements (tumeur, infection virale, etc).

L'invention concerne également un procédé pour le transfert d'un acide nucléique dans une cellule caractérisé en ce que l'on cultive ladite cellule en présence de l'acide nucléique et d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires.

Par ailleurs, les complexes acide nucléique-oligopeptide de la présente invention permettent également l'encapsulation des acides nucléiques dans des vecteurs de transfert avec des rendements considérablement améliorés. Pour diminuer les problèmes de stabilité et de pénétration dans les cellules, les acides nucléiques peuvent en effet être associés à des transporteurs ou à des vecteurs de médicament appropriés. L'encapsulation des acides nucléiques dans de tels vecteurs de transfert permet de les protéger des nucléases sériques, de faciliter leur pénétration dans les cellules où se trouve leur cible pharmacologique, et de ralentir leur élimination. Toutefois, la

difficulté majeure limitant l'utilisation de ces vecteurs réside dans les faibles rendements d'encapsulation des acides nucléiques. La demanderesse a maintenant montré que les complexes acide nucléique-oligopeptides de l'invention peuvent être encapsulés dans des vecteurs de transfert avec des rendements élevés. Plus particulièrement, les rendements d'encapsulation des complexes de l'invention dans des nanoparticules sont supérieurs à 50%, alors qu'ils sont inférieurs à 1% avec des acides nucléiques nus, ou avec d'autres oligopeptides ne formant pas de structure secondaires (Cf exemples).

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires pour l'encapsulation d'acides nucléiques dans un vecteur de transfert.

L'invention a également pour objet les vecteurs de transfert d'acides nucléique comprenant une composition telle que définie ci-avant.

Parmi les différents vecteurs de transfert, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention des vecteurs biocompatibles, biodégradables, hydrophobes et de nature protéique ou polymérique. En particulier, les vecteurs préférés selon l'invention sont les liposomes, les nanoparticules ou les lipoprotéines de faible densité (LDL).

Les liposomes sont des vésicules phospholipidiques comportant une phase aqueuse interne dans laquelle les acides nucléiques peuvent être encapsulés. La synthèse de liposomes et leur utilisation pour le transfert d'acides nucléiques est connue dans l'art antérieur (WO91/06309, WO92/19752, WO92/19730). L'utilisation de complexes selon l'invention permet d'améliorer l'efficacité d'encapsulation des acides nucléiques dans les liposomes.

Les nanoparticules sont des particules de petite dimension, généralement inférieure à 500 nm, capables de transporter ou de vectoriser un principe actif (tel qu'un acide nucléique) dans les cellules ou dans la circulation sanguine. La présente invention permet également d'améliorer considérablement les rendements d'encapsulation d'acides nucléiques dans des nanoparticules. Préférentiellement, les nanoparticules selon l'invention sont constituées par des polymères comportant une majorité de motifs dégradables tels que l'acide polylactique, éventuellement copolymérisé à du polyéthylène glycol. D'autres polymères utilisables dans la

réalisation de nanoparticules ont été décrits dans l'art antérieur (voir par exemple EP 275 796; EP 520 889).

5 L'invention concerne donc également un procédé d'encapsulation d'acides nucléiques dans des vecteurs de transfert selon lequel on met en contact le vecteur de transfert ou les composants le constituant, l'acide nucléique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires, ou éventuellement un complexe acide nucléique - oligopeptide déjà formé, dans des conditions permettant l'encapsulation de l'acide nucléique dans ledit vecteur de transfert, puis on récupère le vecteur de transfert formé. Comme indiqué plus haut, le procédé selon l'invention est
10 préférentiellement appliqué pour la préparation de liposomes, de nanoparticules ou de lipoprotéines de faible densité.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant un acide nucléique thérapeutique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires, éventuellement encapsulés dans un vecteur de
15 transfert.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Exemple 1 : Préparation des oligopeptides

Les trois oligopeptides suivants ont été synthétisés :

20 1.1. -(H)-(Leucine-Lysine-Lysine-Leucine)₁₀-(OH) ou (LKKL)₁₀.

Cet oligopeptide a été synthétisé sous forme de sel d'acide trifluoroacétique au moyen d'un synthétiseur de peptides Applied Biosystem 431A, sur une résine HMP (Applied Biosystem) et selon une stratégie F-MOC. Après la synthèse, le peptide a été libéré de la résine par traitement 90 minutes en présence d'une solution TFA/eau 95/5 (v/v),
25 précipité par addition d'ether tertiobutylméthylique, puis purifié par HPLC phase inverse sur colonne C18 100 A (Biorad RSL). La pureté du peptide obtenu est supérieure à 95 % et sa solubilité dans l'eau de 50 mg/ml. Il a été montré que le polytétrapeptide LKKL, non structuré dans l'eau, adopte une conformation en hélice α en solution saline. Cette conformation devrait améliorer la stabilité du complexe par
30 formation de paires d'ions entre les charges positives des lysines de l'oligopeptide et les phosphates ionisés à pH physiologique de l'acide nucléique.

1.2. -(H)-(Leucine-Lysine-Leucine-Lysine)₁₀-(OH) ou (LKLK)₁₀.

Cet oligopeptide a été synthétisé sous forme de sel d'acide trifluoroacétique en suivant le protocole décrit ci-dessus. La pureté du peptide obtenu est supérieure à 90% et sa solubilité dans l'eau de 100 mg/ml. Il a été montré que le polytétrapeptide LKLK, non structuré dans l'eau, adopte une conformation en feuillets β en solution saline ou en présence d'acides nucléiques, en raison de l'interaction entre phosphates et groupements aminés. Le long d'un feuillet β , la distance séparant 2 charges positives est de 6,9 Å, ce qui est compatible avec les 6,2 Å séparant 2 groupements phosphate d'un acide nucléique simple brin. Cette conformation devrait donc améliorer la stabilité du complexe.

1.3. -(H)-(Proline-Lysine-Lysine-Leucine)₁₀-(OH) ou (PKKL)₁₀.

Ce peptide (fourni par A. Brack, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans) n'est pas structuré en solution saline et a été utilisé comme contrôle.

1.4. Polylysine.

La polylysine utilisée est d'origine commerciale. Ce peptide n'est pas structuré en solution saline et a été utilisé comme contrôle.

Exemple 2 : Acides nucléiques utilisés2.1. Acides nucléiques antisens anti-ras Val12

Des acides nucléiques antisens anti ras ont été préparés. Ces acides nucléiques sont des oligonucléotides de 12 et 13 résidus, synthétisés par la société Eurogentec (Belgique). Ces oligonucléotides sont dirigés contre une séquence de l'ARNm de ras muté au niveau du douzième codon. Les acides nucléiques utilisés sont l'antisens (AS-Val), son inverse (INV-Val : la séquence est identique mais orientée dans le sens inverse), ainsi que l'antisens de l'ARNm ras normal (AS-Gly) et qu'un acide nucléique témoin comportant 2 nucléotides non appariés au milieu de la séquence (AS-mut2). La séquences de ces acides nucléiques est la suivante :

3' -CGCGGCAGCCAC-5'	(AS-Val12)
3' - GCGGCAGCCACAC-5'	(AS-Val13)
3' -CACCGACGGCGC-5'	(INV-Val12)

3' -CACACCGACGGCG-5' (INV-Val113)

3' -CGCGGCCCGCCAC-5' (AS-Gly12)

3' -CGCCGGAGCCAC-5' AS-mut212)

2.2. Acide nucléique (d(Tp)15T)

- 5 L'acide nucléique (d(Tp)15T) est composé de 16 thymidines. Il est d'origine commerciale (Pharmacia).

Exemple 3 : Etude de complexation

- 10 Cet exemple illustre la formation de complexes entre les acides nucléiques antisens décrits dans l'exemple 2 et les oligopeptides décrits dans l'exemple 1, dans différentes conditions de force ionique et de concentration (toutes les concentrations en acides nucléiques sont exprimées en phosphate). Il montre que des rendements de complexation très élevés peuvent être obtenus, témoignant ainsi de la stabilité des complexes.

3.1. Complexation en tampon phosphate

- 15 L'acide nucléique (10^{-4} M exprimé en phosphate : $C_{\text{phosphate}} = 12 \times C_{\text{acide nucléique}}$) et l'oligopeptide (concentration variant entre $2 \cdot 10^{-3}$, 10^{-4} et $2 \cdot 10^{-5}$ exprimées en charges positives) ont été mis en contact dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. La solution a ensuite été centrifugée, et l'absorbance (A) à 256 nm (maximum d'absorption des acides nucléiques) déterminée dans le surnageant. Pour
- 20 chaque valeur du rapport R (Nombre de charges positives de l'oligopeptide / Nombre de charges négatives de l'acide nucléique) testée, la valeur A/A0 est déterminée, permettant d'évaluer la fraction d'acide nucléique libre et, par différence, la fraction complexée. Pour un rapport R = 1, la concentration en oligopeptide exprimée en lysine est donc de 10^{-4} M.
- 25 Les résultats obtenus montrent que la fraction de complexe précipitant AS-Val13/LKKL₁₀ ou INV-Val13/LKKL₁₀ est de 85 % pour un rapport R = 2. Pour un rapport R = 1, la fraction de complexe précipitant AS-Val13/LKKL₁₀ et INV-Val13/LKKL₁₀ est inférieure : 30 %. Ces résultats peuvent s'expliquer par une
- 30 compétition entre les phosphates du tampon et les phosphates de l'acide nucléique pour la formation du complexe. Ces résultats sont cependant supérieurs à ceux

obtenus avec l'oligopeptide controle : 15 % de complexe INV-Val13/PKKL10 précipitant seulement.

3.2. Complexation en tampon Tris-HCl

5 L'acide nucléique (10^{-4} M) et l'oligopeptide (concentration variable) ont été mis en contact dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,4. La solution a ensuite été centrifugée, et l'absorbance à 256 nm déterminée dans le surnageant. Pour chaque valeur du rapport R testée, la valeur A/A0 est déterminée comme précédemment.

10 Les résultats obtenus montrent que la fraction de complexe précipitant AS-Val13/LKKL10 et AS-Val13/LKLK10 est de 100 % pour un rapport R = 1. Pour un rapport R = 2, la fraction de complexe précipitant AS-Val13/LKLK10 est également de 100 %. Par ailleurs, 100 % de complexe précipitant AS-Val13/LKKL10 ont également été obtenus avec une concentration d'acide nucléique de $2 \cdot 10^{-5}$ M et un rapport R = 1.

15 En revanche, en ce qui concerne le complexe AS-Val13/PKKL10, seulement 70 % des acides nucléiques impliqués dans le complexe précipite ce qui démontre que l'affinité des oligopeptides selon l'invention est supérieure.

3.3. Complexation dans l'eau

20 Le protocole ci-dessus a été répété en remplaçant le tampon Tris-HCl par de l'eau. Les mêmes résultats ont été obtenus (100 % de complexation pour R = 1), démontrant l'affinité élevée des oligopeptides de l'invention pour les acides nucléiques.

3.4. Conclusions

25 L'ensemble de ces résultats démontre le rendement élevé de complexation des oligopeptides de l'invention aux acides nucléiques, et le fait que ce rendement est indépendant de la séquence et de la concentration de l'acide nucléique utilisé. Par ailleurs, comme le montre le tableau ci-après, l'étude des spectres dichroïques a permis de confirmer les structures secondaires adoptées par les oligopeptides cationiques utilisés, en solution ou après complexation.

Peptide	Tampon Phosphate 50mM	Tampon Phosphate 50mM / NaCl 0,2M	Eau	Eau / acide nucléique
LKKL	hélice α	hélice α	non structuré	hélice α
LKLK	feuillet β	feuillet β	non structuré	feuillet β
PKKL	non structuré	non structuré	non structuré	non structuré

Exemple 4 : Etude de l'encapsulation dans un vecteur de transfert : les nanoparticules.

Cet exemple illustre les propriétés très avantageuses des complexes de l'invention, permettant l'encapsulation d'acide nucléique dans des vecteurs de transfert avec des rendements très élevés.

5

4.1. Nanoparticules utilisées : Les nanoparticules utilisées dans cet exemple sont des copolymères dibloc constituées d'un poly (D,L acide lactique) lié par une liaison ester à un poly (éthylène glycol) : PLAp(M)-PEG(N) où M et N sont respectivement les masses moléculaires moyennes (en kD) du PLA et du PEG, et p, le pourcentage d'acide L-lactique. Les 2 types de nanoparticules utilisés sont du PLA50(30)-PEG(2) et du PLA50(30)-PEG(5). Ces copolymères peuvent être synthétisés par toute technique connue de l'homme du métier (voir par exemple EP 520 889).

10

4.2. Marquage radioactif des acides nucléiques :

Les acides nucléiques ont été traités avec de la polynucléotide kinase du phage T4 (Biolabs) en présence d'ATP- $\gamma^{32}\text{P}$ (Amersham) dans un tampon kinase. Après 30 min d'incubation à 37°C, l'acide nucléique a été séparé de l'ATP n'ayant pas réagi par dépôt sur colonne Séphadex G25 (Quick Spin) et centrifugation.

15

4.3. Encapsulation de l'acide nucléique INV-Val13

Cet exemple décrit l'encapsulation de l'acide nucléique INV-Val13 dans une nanoparticule de PLA50(30)-PEG(2) en présence ou en l'absence d'oligopeptide (LKKL)₁₀.

20

Le polymère utilisé (PLA50(30)-PEG(2)) a été solubilisé dans 1 ml d'acétone à une concentration de 10 g/l. La dilution isotopique de l'acide nucléique (concentration finale 10^{-5} M) a été ajoutée, puis l'oligopeptide (à une concentration telle que $R = 1$). La solution organique obtenue a ensuite été versée goutte à goutte dans 5 ml d'une solution aqueuse (tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4), sous agitation. Le polymère insoluble dans le mélange eau/acétone précipite sous forme de nanoparticules, emprisonnant le complexe acide nucléique-oligopeptide. L'acétone a ensuite été éliminée par évaporation sous vide partiel, jusqu'à un volume final de 2,5 ml. Enfin, la suspension nanoparticulaire a été filtrée à travers un filtre Sartorius de porosité 1,2 μ m, qui tient lieu de crible de dispersion et d'injectabilité.

Une expérience contrôle a été effectuée dans les mêmes conditions, mais en l'absence de l'oligopeptide (LKKL)₁₀.

Les résultats obtenus montrent que le rendement d'encapsulation de INV-Vall3 dans la nanoparticule est de 56 % en présence de l'oligopeptide, et de 5 % seulement sans l'oligopeptide.

Le rendement d'encapsulation correspond au pourcentage d'acide nucléique encapsulé dans les nanoparticules, par rapport à la quantité totale d'acide nucléique présente au départ.

4.4. Encapsulation de l'acide nucléique (d(Tp)15T)

Le rendement d'encapsulation de l'acide nucléique (d(Tp)15T) (exemple 2.2.) dans une nanoparticule de PLA50 a été étudié, en présence des oligopeptides cationiques suivants :

- LKKL_n Hélice α : synthétisé en phase homogène sous forme d'un mélange de peptides de poids moléculaire moyen de 34900.
- 25 - LKLK_n Feuillet β : synthétisé en phase homogène sous forme d'un mélange de peptides de poids moléculaire moyen de 7400.
- PKKL_n Pas de structure secondaire
- K_n Pas de structure secondaire

ou de sphingosine (lipide membranaire chargé positivement).

- Pour cela, l'acide nucléique (d(Tp)15T) a été mélangé à l'oligopeptide en solution dans l'eau. En ce qui concerne la sphingosine, elle est solubilisée dans un mélange eau/éthanol 50 % v/v. Les concentrations utilisées sont indiquées dans le tableau qui suit. 100 µl d'une solution d'acide polylactique (PLA₅₀) solubilisée dans l'acétone à une concentration de 20 g/l ont été ajoutés au mélange, ainsi que 300 µl d'acétone pure (concentration finale en PLA₅₀ : 5 g/l). Après homogénéisation au vortex, le mélange a été versé goutte à goutte dans une solution aqueuse de pluronic F68 à 2,5 % (p/v) afin de précipiter le polymère sous forme d'une suspension colloïdale nanoparticulaire turbide. La turbidité a été appréciée à l'oeil. Le diamètre des nanoparticules (175 +/- 40 nm) a été mesuré par diffusion quasi élastique de la lumière sur un appareil BI 90 (Brookhaven Instrument Corporation). L'acétone a ensuite été évaporée sous vide pendant une heure. La suspension a ensuite été filtrée sur filtre millipore AP20 (diamètre des pores : 1,5 µm), préalablement mouillé avec la solution de pluronic F68 à 2,5 %.
- Le rendement d'encapsulation a été déterminé et est reporté dans le tableau qui suit.

Peptide	LKKLn	LKLKn	PKKLn	Kn	Sphingo.
Structure	Hélice α	Feuillet β	aucune	aucune	aucune
Concentration du peptide (mM)	5	12,5	9,2	1	2,2
Volume de peptide dans le mélange (µl)	11,4	65	48	60	27
Quantité de peptide (nmol)	57	812	442	60	60
Concentration de d(Tp)15T	71 µM				
Volume de d(Tp)15T	28 µl				
Quantité de d(Tp)15T	2 nmol				
R	2	27	14,7	2	2
Rendement	42,8	7,8	0,8	0,3	1,3

- Ces résultats montrent clairement que les oligopeptides de l'invention permettent d'encapsuler les acides nucléiques avec des rendements nettement supérieurs à ceux obtenus avec des oligopeptides de l'art antérieur (polylysine) ou ne formant pas de structures secondaires (PKKL).

Exemple 5 : Transfert d'acide nucléique dans les cellules

Cet exemple illustre la capacité des composition de l'invention à transférer des acides nucléiques dans les cellules.

5 5.1. Cellules utilisées : Les essais de transfert d'acide nucléique décrits dans cet exemple ont été effectués sur une lignée de cellules issue d'un carcinome vésical humain, désignée T24/EJ accessible à l'ATCC. Les cellules ont été cultivées dans un milieu MEM-EAGLE ("minimum essential medium", Biological Industries) supplémenté en L-glutamine ((5 mM), streptomycine (50 u/ml), pénicilline (50 u/ml), en présence de 7 % de sérum de veau foetal décomplémenté 30 min à 60°C.

10 5.2. Transfert des acides nucléiques : Les cellules (1500 / puits) ont étéensemencées dans des microplaques de 96 puits, en absence ou en présence d'acide nucléique, encapsulé ou non dans des nanoparticules, dans un volume total de 100 µl. Chaque point a été effectué en triple. La concentration en acide nucléique utilisée a été ajustée par dilution dans de l'eau ou par concentration par centrifugation 1 h à 12000 rpm.
15 Dans ce cas, la suspension est centrifugée, le culot pesé puis le volume ajusté.

L'efficacité du transfert a été déterminée par mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par l'acide nucléique antisens, après 72 ou 96 heures de culture à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Pour cela, 2 méthodes ont été utilisées :

20 - Tout d'abord, l'incorporation de thymidine tritiée, qui a été déterminée après addition de 2 µCi de 3H thymidine par puits. Après 6 heures d'incubation à l'étuve, les plaques ont été lavées au Skatron (Lier, Norvège), l'ADN recueilli sur un filtre, et chaque rondelle du filtre (correspondant à chaque puits de la plaque) placée dans du liquide à scintillation puis comptée au compteur (LKB Wallac 1211 Minibeta). Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs obtenues dans chacun des 3 puits.

25 - Ensuite, la prolifération cellulaire a été évaluée par comptage des cellules en cellule de Malassez. Pour cela, le surnageant a été éliminé, les cellules trypsinisées (10 min à 37°C), puis additionnées de milieu de culture avant d'être comptées.

Les résultats obtenus sont les suivants :

30 - AS-Val12, nu, 30 µM42 % d'inhibition
- AS-Val12/LKKL/nanoparticule, 100 nM (exprimé en antisens) .50 % d'inhibition
- nanoparticule blanche, même quantité de polymère.....< 5 % d'inhibition

- AS-Val12/LKKL/nanoparticule, 500 nM.....95 % d'inhibition

Ces résultats démontrent clairement l'efficacité des compositions de l'invention pour le transfert d'acides nucléiques. De plus, ils montrent que l'acide nucléique transféré conserve ses propriétés fonctionnelles, dans le cas présent, son activité d'antisens.

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant un acide nucléique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires.
2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'oligopeptide
5 est capable de former des hélices α ou des feuillets β .
3. Composition selon la revendication 2 caractérisée en ce que l'oligopeptide répond à la formule $(A_O A_Y A_Y A_O)_n$ ou $(A_O A_Y A_O A_Y)_n$ dans laquelle A_O est un acide aminé hydrophobe, A_Y est un acide aminé hydrophile, et n est un nombre entier supérieur ou égal à 4.
- 10 4. Composition selon la revendication 3 caractérisée en ce que l'acide aminé hydrophobe est choisi parmi la leucine, la valine, l'isoleucine et la phénylalanine.
5. Composition selon la revendication 3 caractérisée en ce que l'acide aminé hydrophile est choisi parmi la lysine, l'arginine et l'histidine.
6. Composition selon la revendication 3 caractérisée en ce que l'oligopeptide
15 est choisi parmi $(LKKL)_n$, $(LKLK)_n$, $(LRRL)_n$.
7. Composition selon la revendication 6 caractérisée en ce que n est compris entre 4 et 100, de préférence entre 10 et 50.
8. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.
- 20 9. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.
10. Composition selon la revendication 8 ou 9 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.
11. Composition selon la revendication 8 ou 9 caractérisée en ce que l'acide
25 nucléique est un antisens.
12. Composition selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

13. Composition selon l'une des revendications 8 à 12 caractérisée en ce que le rapport charges positives de l'oligopeptide / charges négatives de l'acide nucléique est égal ou supérieur à 1.

14. Vecteur de transfert d'acides nucléique comprenant une composition selon
5 l'une des revendications précédentes.

15. Vecteur de transfert selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'une nanoparticule, d'un liposome ou d'une lipoprotéine de faible densité.

16. Procédé d'encapsulation d'acides nucléiques dans des vecteurs de transfert caractérisé en ce que l'on met en contact le vecteur de transfert ou ces composants,
10 l'acide nucléique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires, ou éventuellement un complexe acide nucléique-oligopeptide déjà formé, dans des conditions permettant l'encapsulation de l'acide nucléique dans ledit vecteur de transfert, puis on récupère le vecteur de transfert formé.

17. Procédé pour le transfert d'un acide nucléique dans une cellule caractérisé
15 en ce que l'on cultive ladite cellule en présence de l'acide nucléique et d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires.

18. Utilisation d'un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

19. Utilisation selon la revendication 18 pour le transfert in vitro, ex vivo ou
20 in vivo.

20. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique thérapeutique et un oligopeptide cationique capable de former des structures secondaires, éventuellement encapsulés dans un vecteur de transfert.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00098

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/87 C12N15/11 C07K14/00 A61K48/00 A61K9/127
A61K9/50 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1993), 90(3), 893-7, LEGENDRE, J.-Y. ET AL. 'Cyclic amphipathic peptide-DNA complexes mediate high-efficiency transfection of adherent mammalian cells' see the whole document	1,2,8, 13-20
Y	---	3-5,7-12
Y	WO,A,93 07892 (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA) 29 April 1993 see page 8, line 10 - page 10 * SEQ IDs 91-96 *	3-5,7
Y	WO,A,92 22651 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 23 December 1992 see the whole document ---	8-11
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 1995

Date of mailing of the international search report

20.06.95

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00098

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,91 17773 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 28 November 1991	12
A	see page 11, line 1 - line 16 see page 16, paragraph C ---	1-20
X	TETRAHEDRON, vol. 47, OXFORD GB, page 4113 ERITJA, R. ET AL. 'Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence' see the whole document ---	1,8,11
X	EP,A,0 424 688 (STADLER, J. & ANTONELLI, N.) 2 May 1991 see the whole document ---	1,8, 14-19
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, WASHINGTON US, page 4255 WAGNER, E. ET AL. 'Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells' see the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/00098

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 19 and 18 (in so far as they pertain to in vivo procedures) concern a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out based on the alleged effects of the product (compound).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/FR 95/00098

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9307892	29-04-93	AU-A-	2901692	21-05-93
		CA-A-	2120337	17-04-93
		JP-T-	7500342	12-01-95

WO-A-9222651	23-12-92	AU-A-	2249792	12-01-93
		CA-A-	2111472	23-12-92
		EP-A-	0590082	06-04-94
		JP-T-	6504679	02-06-94
		WO-A-	9408003	14-04-94

WO-A-9117773	28-11-91	DE-A-	4110410	01-10-92
		EP-A-	0532525	24-03-93

EP-A-0424688	02-05-91	US-A-	5286634	15-02-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Démr Internationale No
PCT/FR 95/00098

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/87 C12N15/11 C07K14/00 A61K48/00 A61K9/127 A61K9/50 A61K31/70		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C07K A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche 		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) 		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1993), 90(3), 893-7, LEGENDRE, J.-Y. ET AL. 'Cyclic amphipathic peptide-DNA complexes mediate high-efficiency transfection of adherent mammalian cells'	1,2,8, 13-20
Y	voir le document en entier ---	3-5,7-12
Y	WO,A,93 07892 (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA) 29 Avril 1993 voir page 8, ligne 10 - page 10 * SEQ IDs 91-96 * ---	3-5,7
Y	WO,A,92 22651 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 23 Décembre 1992 voir le document en entier --- -/--	8-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*A* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">24 Mai 1995</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">20.06.95</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Andres, S</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No
PCT/FR 95/00098

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,91 17773 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 28 Novembre 1991	12
A	voir page 11, ligne 1 - ligne 16 voir page 16, alinéa C ----	1-20
X	TETRAHEDRON, vol. 47, OXFORD GB, page 4113 ERITJA, R. ET AL. 'Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence' voir le document en entier ----	1,8,11
X	EP,A,0 424 688 (STADLER, J. & ANTONELLI, N.) 2 Mai 1991 voir le document en entier ----	1,8, 14-19
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, WASHINGTON US, page 4255 WAGNER, E. ET AL. 'Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells' voir le document en entier -----	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR95/00098

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que les revendications 19 et 18 (pour autant qu'elles aient pour objet des procédés *in vivo*) concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n°^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{os}:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{os}:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema Internationale No

PCT/FR 95/00098

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9307892	29-04-93	AU-A-	2901692	21-05-93
		CA-A-	2120337	17-04-93
		JP-T-	7500342	12-01-95

WO-A-9222651	23-12-92	AU-A-	2249792	12-01-93
		CA-A-	2111472	23-12-92
		EP-A-	0590082	06-04-94
		JP-T-	6504679	02-06-94
		WO-A-	9408003	14-04-94

WO-A-9117773	28-11-91	DE-A-	4110410	01-10-92
		EP-A-	0532525	24-03-93

EP-A-0424688	02-05-91	US-A-	5286634	15-02-94
